三带喙库蚊体内猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与鉴定

史开志，文　明*，周碧君，王开功，汪德生
（贵州大学动物科学学院动物疫病研究所，贵阳 550025）

摘要：【目的】调查猪场蚊虫是否能携带猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）病毒。【方法】采集发生 PRRS 疫情的 3 个养猪场蚊虫样本，采用 RT-PCR 方法检测 PRRS 病毒核酸，取阳性蚊虫样本接种 Marc-145 细胞进行病毒的分离培养，以间接免疫荧光抗体技术和分子克隆技术进行病毒的鉴定。【结果】养猪场内的蚊虫主要有三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhychus*、凶小库蚊 *Culex modestus*、中华按蚊 *Anopheles sinensis* 和骚扰阿蚊 *Armigeres obturbans*，其中三带喙库蚊占 86.76%；以 PRRS 病毒 N 基因引物进行扩增，三带喙库蚊样本呈现阳性反应，而其他蚊种均为阴性。在蚊虫接种的 Marc-145 细胞中可见细胞融合和空泡形成等细胞病变效应；用抗 PRRS 病毒 N 蛋白抗体和羊抗猪 IgG（H + L）-FITC 进行间接免疫荧光染色，感染细胞呈现黄绿色荧光；以 NSP2 基因引物进行 RT-PCR 扩增、克隆与测序，发现库蚊源病毒与相应猪场猪源病毒中相应基因的序列具有较高同源性。【结论】三带喙库蚊为猪舍优势蚊种，并能携带猪繁殖与呼吸综合征病毒。

关键词：三带喙库蚊；猪繁殖与呼吸综合征病毒；分离；鉴定；猪场
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)05-0509-05

Isolation and identification of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in pig farms

SHI Kai-Zhi, WEN Ming*, ZHOU Bi-Jun, WANG Kai-Gong, WANG De-Sheng (Institute of Animal Disease, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: 【Objective】To determine whether the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can survive in mosquitoes in infected pig farms. 【Methods】The mosquito samples were collected from 3 pig farms infected by the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and determined by RT-PCR method based on the primers of PRRSV N gene, then the PCR-positive mosquitoes were cultured in Marc-145 cells for isolation of PRRSV, which was identified by indirect immuno-fluorescence assay and sequence analysis of Nsp2 gene. 【Results】At least 4 mosquito species, *Culex tritaeniorhychus*, *Culex modestus*, *Anopheles sinensis* and *Armigeres obturbans* were identified on 3 pig farms and *C. tritaeniorhynchus* was found to be the predominant species (86.76%). By RT-PCR, PRRSV was detected in the samples of *Culex tritaeniorhychus* but none in other 3 mosquito species. The cell pathological effects such as cell fusion and cavitation were observed in Marc-145 cells inoculated by the samples of *C. tritaeniorhynchus*. The antigen of PRRSV in cultural cells was detected by indirect immunofluorescence assay. The PRRSV NSP2 gene, which was amplified and sequenced from infected moisquito cells, was highly homologous in nucleotide sequence with those from the infected pigs in same farm. 【Conclusion】*C. tritaeniorhynchus* is the predominant species and PRRSV can survive in this mosquito.

Key words: *Culex tritaeniorhynchus*; porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); isolation; identification; pig farm

猪繁殖与呼吸综合征（porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）引起猪的一种以母猪繁殖障碍和仔

基金项目：贵州省农业厅兽医科技计划项目[黔农畜专项 20080408]
作者简介：史开志，男，1985 年生，硕士研究生，主要从事病原分子生物学研究。
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: as.mwen@gzu.edu.cn
收稿日期 Received: 2008-08-08；接受日期 Accepted: 2009-04-03

猪呼吸道症状为主要特征的传染病。该病在 1987 年首次在美国首次爆发后不到 10 年时间几乎传遍全世界养猪国家(Albina *et al.*, 1997)。2006 年以后,我国发生了由 PRRSV 变异毒株引起的高致病性 PRRS 疫情,给养猪业造成了巨大经济损失(Tian *et al.*, 2007;童光志等, 2007;吴锦艳等, 2008;张建武等, 2008)。

猪是 PRRSV 的自然感染宿主,传染源有感染猪、公猪精液、污染的用具和车辆等(Christopher-Hennings *et al.*, 1995; Otake *et al.*, 2002a; Dee *et al.*, 2004),而气溶胶、家蝇 *Musca domestica* 和刺扰伊蚊 *Ades vexans* 等可传播或携带该病毒(Otake *et al.*, 2002b, 2003a, 2003b; Pringproa *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007)。本研究通过采集猪场蚊虫样本,采用 RT-PCR 检测 PRRSV,并对阳性样本进行细胞分离培养和鉴定,以期明确猪场蚊虫种类及其携带 PRRSV 情况,为猪场 PRRS 的有效预防与控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 蚊虫和细胞

蚊虫样本,采自经猪群血样 PRRSV RT-PCR 检测为阳性的黔西、乌当和花溪 3 个猪场以及为阴性的六盘水、遵义和都匀 3 个猪场,待其消化宿血 24 h 后进行鉴定;Marc-145 细胞,购自四川农业大学动物生物技术中心。

1.2 主要试剂

AMV RTnase 购自 BioFlux 公司;RNase Inhibitor 为 TOYOBO 公司产品;Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司;抗 PRRSV-N 蛋白抗体为 IDEXX Labs 产品;羊抗猪 IgG (H + L)-FITC 购于 Southern Biotech 公司;感受态细菌 *Escherichia coli* DH5α 由本实验室提供;其他试剂均为 TaKaRa 公司产品。

1.3 主要仪器

倒置显微镜和荧光显微镜,为重庆光学仪器厂产品;台式冷冻离心机,为 Sigma 公司产品;PCR 扩增仪(TC-412),为 PERKIN 公司产品;三恒电泳仪,为北京六一厂产品;凝胶成像系统,为 SYGENE 公司产品。

1.4 蚊虫样本鉴定与 PRRSV 核酸检测

蚊虫种类鉴定:委托贵州大学昆虫研究所郭建军博士进行鉴定。

PRRSV 核酸检测:按不同种类各取蚊虫 30 头,加入适量稀释液(含 5% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液)后研磨,按常规方法提取病毒 RNA,以 PRRSV N 基因引物(N1: 5′-AATATGCCAAATAACAACGG-3′; N2: 5′-CTA CATGCTGAGGGTGATGC-3′)进行 RT-PCR 检测。每个蚊种随机取样 3 次。

1.5 病毒分离培养与 PRRSV 抗原检测

病毒分离培养:取 RT-PCR 检测为阳性的蚊种样本 30 个,加适量双抗溶液后研磨并冻融 3 次,过滤除菌,接种到已培养成单层的 Marc-145 细胞上,37℃ 培养 7 d,观察细胞病变。并设 PRRSV 阳性对照和阴性蚊虫对照。

PRRSV 抗原检测:取已培养 3 ~ 4 d 的细胞培养物制备细胞抹片,以 PRRSV-N 蛋白抗体和羊抗猪 IgG(H + L) -FITC 进行荧光抗体检测,于荧光显微镜下观察细胞荧光显色情况。

1.6 PRRSV Nsp2 基因的克隆与序列分析

取有明显病变效应的细胞培养物,按常规方法提取病毒 RNA,以 PRRSV Nsp2 基因引物(S1: 5′-CGATGATGGCTTGAGCTGAGTAT-3′; S2: 5′-GGAGGCACCACGTTGTTTTCAAC-3′)进行 RT-PCR 扩增,Gel Extraction Kit 回收扩增产物,连接 pMD-18T,转化 DH-5α 感受态细胞,筛选鉴定后,送至大连宝生物工程有限公司测序,并与相应猪场猪源 PRRSV 流行株(EU140620 和 EU140621)以及国内参考株 CH-1a 株(AY032626)和 JX-A1 株(EF112445)进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 蚊虫样本鉴定与 PRRSV 核酸检测结果

对贵州省 6 个猪场的蚊虫样本进行的调查显示,猪舍的主要蚊虫有三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhychus* (86.76%)、凶小库蚊 *Culex modestus* (8.71%)、中华按蚊 *Anopheles sinensis* (3.40%)和骚扰阿蚊 *Armigeres obturbans* (1.13%),其中三带喙库蚊 *C. tritaeniorhychus* 为猪舍的优势蚊种(表 1)。

采用 PRRSV N 基因引物对 4 种蚊虫样本进行的病毒核酸检测显示,在猪群血清检测为 PRRSV 阳性的猪场三带喙库蚊均检出 PRRSV 核酸阳性,而其他蚊种和健康猪场对照蚊种均为阴性,结果见表 2。

2.2 病毒分离培养与 PRRSV 抗原检测结果

将 RT-PCR 检测为 PRRSV 核酸阳性的三带喙库蚊样本处理液接种 Marc-145 细胞,孵育 3 ~ 5 d 后可见典型的细胞病变,如细胞融合、空泡形成以及细胞脱落和崩解等。而阴性对照在相同孵育时间内未见明显变化。

表 1　猪舍蚊虫样本的数量与百分率

Table 1　Number and percentage of mosquito species identified from six pig farms

猪场 Pig farm	采集日期 Collecting date	蚊虫数量 Number of moisquitos	占总数比例 Ratio(%)			
			三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhychus*	凶小库蚊 *Culex modestus*	中华按蚊 *Anopheles sinensis*	骚扰阿蚊 *Armigeres obturbans*
黔西猪场 Qianxi farm	08-08-05	320	85.62	9.69	3.13	1.56
乌当猪场 Wudang farm	08-09-10	298	87.92	8.05	3.02	1.01
花溪猪场 Huaxi farm	08-09-20	266	87.97	7.52	3.38	1.13
水城猪场 Shuicheng farm	08-10-12	162	87.65	8.02	3.71	0.62
遵义猪场 Zunyi farm	08-10-16	156	85.90	10.26	3.20	0.64
都匀猪场 Douyun farm	08-10-20	210	85.24	9.05	3.81	1.90
总计 Total		1 412	86.76	8.71	3.40	1.13

表 2　猪场蚊虫 PRRSV 核酸检测结果

Table 2　PRRSV detection in mosquitoes from six pig farms

猪场 Pig farm	猪群状况 Condition of pig samples	三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhychus*	凶小库蚊 *Culex modestus*	中华按蚊 *Anopheles sinensis*	骚扰阿蚊 *Armigeres obturbans*
黔西猪场 Qianxi farm	PRRSV-	+	–	–	–
乌当猪场 Wudang farm	positive	+	–	–	–
花溪猪场 Huaxi farm		+	–	–	–
水城猪场 Shuicheng farm	PRRSV-	–	–	–	–
遵义猪场 Zunyi farm	negative	–	–	–	–
都匀猪场 Douyun farm		–	–	–	–

+:阳性 Positive; –:阴性 Negative; 所有检测均采用 30 头蚊虫/次 All tests were done once with a pool of 30 mosquitoes.

取呈现典型细胞病变的 Marc-145 细胞培养物,制成细胞抹片,以抗 PRRSV-N 蛋白抗体和羊抗猪 IgG(H+L)-FITC 进行染色,在荧光显微镜下可见多少不一、荧光强度不同的黄绿色荧光(图 1),而阴性对照样本的 Marc-145 细胞培养物未见特异性荧光。

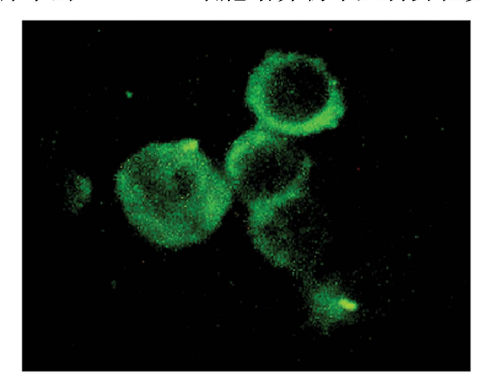


图 1　接种虫蚊样本的 Marc-145 细胞间接免疫荧光检测结果

Fig. 1　IFA results of Marc-145 cells inoculated with the *mosquito* samples

2.3　蚊虫样本 PRRSV Nsp2 基因的克隆与序列分析结果

采用 PRRSV NSP2 基因特异性引物对三带喙库蚊样本的细胞培养物进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳观察,均可见与预期大小相一致的约为 1 060 bp的 DNA 条带,而阴性对照无 DNA 带(图 2)。

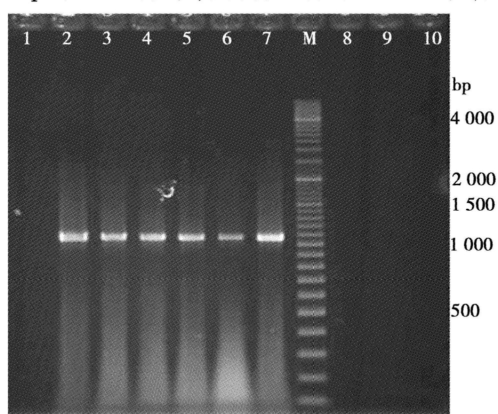


图 2　PRRSV Nsp2 基因引物对蚊虫细胞培养物的 RT-PCR 检测结果

Fig. 2　Results of RT-PCR by the primer to PRRSV Nsp2 gene in culture of mosquitoes

M:DNA 分子量标准物 100 bp Marker; 1:空白对照 Negative control; 2–4:发病猪场猪组织样本 Pig samples in infected farms; 5–7:阳性蚊虫细胞培养物 Culture of mosquitoes in infected farms; 8–10:阴性蚊虫细胞培养物 Culture of mosquitoes in normal farms.

将蚊虫细胞培养物的 RT-PCR 扩增产物进行回收、克隆和测序后，结果显示该基因片段大小为 1 062 bp，与对应猪场的猪源 PRRSV 相应片段大小一致，与我国早期分离株 CH-1a 株少 90 个核苷酸，均为 PRRSV 变异毒株。

应用 DNAman 软件进行序列比对，3 个猪场库蚊的 PRRSV NSP2 基因片段(HX-M，WB-M 和 QX-M)与相应发病猪场猪源 PRRSV 分离株(HX-P，WB-P 和 QX-P)具有较高的核苷酸同源性，达到 99.6%，99.9% 和 99.7%，而与国内近期参考株 JX-A1 株的同源性也达 98.3%，98.1% 和 97.7%，但与早期参考株 CH-1a 株的同源性稍低，只有 91.0%，90.8% 和 90.3%，结果见表 3。

表 3 蚊源与猪源 PRRSV NSP2 基因核苷酸序列同源性(%)比较

Table 3 Nucleocide sequence homology (%) comparison of PRRSV NSP2 gene in mosquito with that in pigs

分离株 Strain	CH-1a	JX-A1	QX-P	QX-M	WB-P	WB-M	HX-P	HX-M
CH-1a	100							
JX-A1	91.6	100						
QX-P	90.4	97.7	100					
QX-M	90.3	97.7	99.7	100				
WB-P	90.9	98.2	99.5	99.4	100			
WB-M	90.8	98.1	99.4	99.3	99.9	100		
HX-P	91.1	98.7	98.7	98.6	99.1	99.0	100	
HX-M	91.0	98.3	98.9	98.8	99.3	99.2	99.6	100

3 讨论

PRRS 自 1987 年美国首次爆发后，很快在全世界养猪国家蔓延流行。郭宝清等(1996)从流产胎儿中分离到该病病原(PRRSV CH-1a 株)，从而证实该病在我国的存在；到 2006 年后，由 PRRSV 变异毒株引起的高致病性 PRRS 疫情，给我国养猪业造成了巨大的经济损失。高致病性 PRRS 的发生，除与基因变异致使病毒的毒力增强有关外，可能与其传播途径相关：感染猪、精液、污染用具、出入车辆、空气以及家蝇、刺扰伊蚊等，均能传播该病毒(Christopher-Hennings *et al*., 1995; Otake *et al*., 2002a, 2002b, 2003a, 2003b; Dee *et al*., 2004; Pringproa *et al*., 2006; Cho *et al*., 2007)。因此，研究分析高致病性 PRRS 的传播途径或传播媒介，对该病的防控具有重要意义。

本研究通过猪场蚊虫种类调查和 RT-PCR 方法检出 PRRSV 核酸阳性蚊种后，采用细胞分离培养、病毒抗原检测和基因克隆测序分析等多种方法证实，三带喙库蚊是猪舍的优势蚊种，并从感染猪场的三带喙库蚊中分离出 PRRSV，这种蚊源分离株在核苷酸序列上与同个养殖场的猪源分离株具有较高的同源性，说明三带喙库蚊在叮咬感染猪群时可以吸入猪体内 PRRSV，并能携带活的 PRRSV 达 24 h 以上，这为 PRRS 的预防与控制提供了一些基础资料。至于三带喙库蚊能否在 PRRSV 的传播与致病上发挥作用，有待进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

Albina E, 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet. Microbiol.*, 55: 309-316.

Cho JG, Deen J, Dee SA, 2007. Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, 71: 23-27.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CL, Yaeger MJ, Benfield DA, 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 456-464.

Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C, 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 68: 128-133.

Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, Cui YZ, 1996. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS. *Chin. J. Anim. Poul. Infect. Dis.*, 87(2): 1-5. [郭宝清，陈章水，刘文兴，崔益洙，1996. 从疑似病例 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. 中国畜禽传染病，87(2): 1-5]

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Joo HS, Deen J, Molitor TW, Pijoan C, 2002a. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet. Rec.*, 150: 114-115.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C, 2002b. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can. J. Vet. Res.*, 66: 191-195.

Otake S, Dee SA, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Farharm M, Pijoan C, 2003a. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can. J. Vet. Res.*, 67: 198-203.

Otake S, Dee SA, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Pijoan C, 2003b. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, 67: 265-270.

Pringproa K, Chungprivat S, Pangyathong R, Thanawongnuweeh R, 2006. *Culex tritaeniorhynchus* is unlikely to be a vector for the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).

Thai. J. Vet. Med., 36(4): 21－31.

Tian KG, Yu XL, Zhao TZ, Feng YJ, Cao Z, Wang CB, Hu Y, Chen XZ, Hu DM, Tian XS, Liu D, Zhang S, Deng XY, Ding YQ, Yang L, Zhang YX, Xiao HX, Qiao MM, Wang B, Hou LL, Wang XY, Yang XY, Kang LP, Sun M, Jin P, Wang SJ, Kitamura Y, Yan JH, Gao GF, 2007. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE*, 2(6): e526. doi: 10. 1371/ Journal. pone. 0000526.

Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, Qiu HJ, Peng JM, An TQ, 2007. Identification and molecular epidemiology of the very virulent porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerged in China. *Chin. J. Prev. Vet. Med.*, 29(5): 323－327. [童光志, 周艳君, 赫晓芳, 田志军, 仇华杰, 彭金美, 安同庆, 2007. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析. 中国预防兽医学报, 29(5): 323－327]

Wu JY, Tian H, Shang YJ, Zheng HX, Jin Y, Yin SH, Zhao N, Man ZP, Liu XT, Xie QG, 2008. Isolation and Nsp2 genetic characterization of one strain HN/XT/07 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Science in China*., 38(12): 1 033－1 037. [吴锦艳, 田宏, 尚佑军, 郑海学, 靳野, 尹双辉, 赵娜, 满自萍, 刘湘涛, 谢庆阁, 2008. 猪生殖与呼吸综合征病毒 HN/XT/07 株的分离鉴定及其 Nsp2 基因的特性分析. 中国兽医科学, 38(12): 1 033－1 037]

Zhang JW, Zhuang JS, Yuan SS, 2008. Molecular epidemiology study on high pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in some regions of China. *Sci. Agri. Sin.*, 41(6): 1 822－1 831. [张建武, 张金山, 袁世山, 2008. 中国部分地区高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子流行病学研究. 中国农业科学, 41(6): 1 822－1 831]

(责任编辑: 赵利辉)